PITTIERIA 28-1998, 31-38

INDUCCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN *Cedrela odorata* L.

Noralba Angarita de Torres e Idel Contreras G.
Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales,
Laboratorio de Cultivos **in vitro**, Mérida-Venezuela

Resumen

Con el objeto de establecer un sistema de regeneración masiva directa de*C. odorata*, que permita la puesta en marcha de un programa de mejoramiento genético, fueron utilizados y cultivados **in vitro**, como explantes, porciones de1 mm de longitud aproximadamente, de embriones cigóticos inmaduros de Cedro. La embriogénesis somática se indujo en un medio nutritivo MS (1962), complementado con (mg/l) myo-inositol 100, vitaminas B5 (Gamborg et al. 1968), sacarosa 30.000 y 2,4-D (4,0 y 6,0) y solidificado con DBA 1,3%. Los embriones fueron incubados en oscuridad total a 27 ± 2° C. Entre tres y cuatro meses después, pudo obervarse estructuras globulares que surgieron directamente de los explantes en el medio que contenía 6 mg/ l de 2,4-D. Hubo un posterior desarrollo de estructuras cotiledonares con hipocotilos achatados, los cuales fueron subcultivados en un medio MS a la mitad de su fuerza iónica carente de auxina, para inducir su alargamiento y eventual germinación.

Palabras clave: **Cedrela odorata**, embriogénesis somática.

Abstract

In order to stablish a mass regeneration direct system of*C. odorata* that allows to achieve an genetic improvement program furthermore, parts of inmature zigotic embryos of cedar with about 1mm lenght, were used as explants and cultured **in vitro**. Somatic embryogenesis was induced in MS(1962) medium supplemented with (mg/l) myo-inositol 100, sucrose 30.000, vitamins B5 (Gamborg et. al.1968), 2,4-D (4,0 and 6,0) and DBA 1,3%. Embryos were incubated in darkness at 27± 2° C. Three or four months later, some globular structures were observed arising directly from the explants on the medium with 6 mg/ l of 2,4-D. Furthermore,

some cotiledonary structures were developed with flattened hypocotyls. These structures were subcultured in a half strenght MS medium, auxin free, in order to get enlargement and eventual germination .
Key words: ***Cedrela odorata***, somatic embryogenesis

Introducción

La explotación selectiva a que han sido sometidas muchas especies leñosas nativas, consideradas valiosas por la calidad de su madera, ha conducido a una disminución progresiva de las mismas, amenazando a algunas de ellas con la extinción. En este grupo de especies, ***Cedrela odorata*** L. es una de las más importantes. Por su rápido crecimiento, ha sido considerada apta para ser utilizada en programas de plantaciones forestales mediante el uso de material producido por los métodos convencionales de propagación vegetativa. Sin embargo, hasta ahora no se logrado alcanzar el éxito esperado debido, entre otros factores, a que esta especie es atacada por un insecto conocido como "el barrenador de las meliaceas" ***Hypsipyla grandella*** Z., lo cual constituye una gran limitación para su recuperación a través de plantaciones puras. Estos problemas han creado la necesidad de utilizar métodos alternativos de propagación vegetativa que puedan contribuir al mejoramiento del cedro, con el objeto de obtener clones seleccionados que eventualmente pudieran ofrecer resistencia al ataque del insecto. ***C. odorata*** es una especie susceptible de ser propagada **in vitro** (Angarita de Torres (1995) y esta capacidad la hace apta para ser regenerada vía embriogénesis somática.

La embriogénesis somática tiene muchas ventajas si se compara con los mètodo convenciales de propagaciòn vegetativa (por ejemplo: estacas enraizadas, injertos etc...) y aún con otros sistemas de regeneración **in vitro** (por ejemplo:propagación clonal rápida). Las mayores ventajas de este tipo de propagaciòn son: por un lado, la alta tasa de multiplicación que puede generar un número ilimitado de embriones a partir de un simple explante. Por otro lado, y esta

es quizás la ventaja màs importante, comparada con otros métodos de propagación clonal, el producto resultante es un embrión, con raíz, vástago, hojas (o al menos los cotiledones) y lo fundamental, el "programa" para producir plantas completas (Merckle *et. al.*, 1990).

En este sentido, el Laboratorio de Cultivos **in vitro**, de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes en Mérida, Venezuela, ha realizado diversos trabajos de investigación sobre cultivo **in vitro** de algunas especies tanto de gimnospermas como de latifoliadas leñosas, entre los cuales cabe mencionar : micropropagación de ***Eucalyptus globulus*** (Contreras y Valera, 1988 (a)), micropropagación de ***Pinus caribaea*** var. *hondurensis* y ***P. oocarpa*** (Contreras y Valera, 1988 (b)), entre otros.

Este trabajo muestra los resultados obtenidos en la inducción de la embriogénesis somática de ***C. odorata*** L. partiendo de porciones de embriones cigóticos inmaduros.

Materiales y Métodos

1. *Material vegetal*

   Se utilizaron como explantes, porciones de 1 mm de longitud de embriones cigóticos inmaduros de cedro, provenientes de frutos de dos árboles ubicados en la zona sur de la ciudad de Mérida.

2. *Medios*

   El medio de inducción fue MS (1962) fórmula completa, complementado con (mg/l) myo-inositol 100, vitaminas B5, sacarosa 30.000 y 2,4-D (4,0 y 6,0), solidificado con DBA al 1,3%.

   Para el subcultivo, se utilizó el MS(1962) a ½ de su fuerza iónica con iguales complementos orgánicos a los del medio de inducción, sin la hormona de crecimiento. El pH fue ajustado a 5.70 con NaOH 1,N y HCl 0,1N. Los medios fueron dispensados en tubos de ensayo a razón de 10ml por tubo. Los medios se esterilizaron a 21°C y 1,05 Kg cm^{-2} de presión y fueron almacenados en cuarto estéril.

3. *Esterilización de los frutos*
Las cápsulas inmaduras d e cedro contentivas de los embriones fueron esterilizadas de acuerdo al siguiente procedimiento:
a. Inmersión en alcohol al 70% por 1 minuto. Enjuague con agua destilada 3 veces.
b. Agitación en jabón líquido comercial por 5 minutos, enjuague con agua destilada 3 ó 4 veces.
c. Asperjado y cepillado con antimicótico concentrado comercial (Betadine). Inmersión en esta solución por 10 minutos. Enjuague con agua destilada 3 ó 4 veces.
d. Inmersión en Benlate 7 g/l hasta el momento del cultivo. Enjuague en la cámara de cultivo con agua destilada estéril 3 ó 4 veces.

4. *Método de cultivo*
En la cámara de cultivo, los frutos fueron abiertos para extraer las semillas. Los embriones cigóticos inmaduros fueron escindidos en porciones de aproximadamente 1mm de longitud;y colocados individualmente en el medio de iniciación e incubados en oscuridad total a una temperatura de 27±2° C.
Se hicieron observaciones periódicas durante cuatro meses. Aquellos embriones que exhibieron estructuras embrionales fueron subcultivados en un medio fresco, sin hormonas de crecimiento, con el objeto de inducir su alargamiento y posible germinación.

Resultados y Discusión

Después de transcurrido un mes de incubación, se observó que de los explantes embrionales proliferaron pequeñas protuberancias blanquecinas refringentes (Fig. 1a). Alrededor de los tres meses, estas protuberancias comenzaron a exhibir formas globulares y acorazonadas, características de los embriones en desarrollo (Fig. 1b). Este proceso se mantuvo durante todo el perìodo

de observación. Se observó que estas estructuras embrionales se originaron de la zona hipocotilar del explante. Resultados similares fueron obtenidos por Kurten *et. al.* (1990) trabajando con explantes embrionales inmaduros de ***Betula pendula***, en un medio con 2,4-D y Cinetina. Los embriones somáticos obtenidos pueden ser observados en la Fig. 1c. Algunos de ellos estaban agrupados, mientras otros parecían crecer independientes. Estos últimos mostraron mayor grado de madurez. Los embriones que exhibieron formas definidas fueron subcultivados en un medio fresco, similar al medio de iniciación; pero sin la hormona de crecimiento. Esta embriogénesis directa no resultó en una proliferación masiva de embriones. También se observó que los embriones somáticos obtenidos, mostraron estructuras cotiledonares dobles, quíntuples y en otros casos, tenían aspecto de yemas caulinares. Resultados similares fueron reportados por Veitez y Barciela (1990) cuando indujeron embriogénesis en ***Camelia japonica*** a partir de tejidos embrionarios. Ninguno de los embriones obtenidos germinó al ser transferido a un medio fresco sin hormonas ; pero comenzaron a generar callo friable granuloso, lo cual dió lugar a que en etapas subsiguientes de subcultivo, se produjera embriogénesis recurrente (Contreras, I. inf. pers.). Merckle (1995) hace referencia a este tipo de resultados al mencionar que las limitaciones de las bajas tasas de multiplicación en la embriogénesis somática de latifoliadas se deben a la baja frecuencia en la producción de embriones somáticos, producción de embriones somàticos malformados, maduración incompleta, baja germinación y baja conversión de los embriones germinados en plántulas. Merckle *et. al.*, (1990), señalan que en algunos casos, estos «embriones primarios» fallan en madurar, pero en cambio dan lugar a sucesivos ciclos de producciòn de nuevos embriones, éstos se originan de células epidérmicas o subepidérmicas de ciertas zonas de los embriones primarios. En el caso presente, no se determinó el origen de los embriones primarios y está por determinarse también el de los embriones secundarios obtenidos posteriormente.

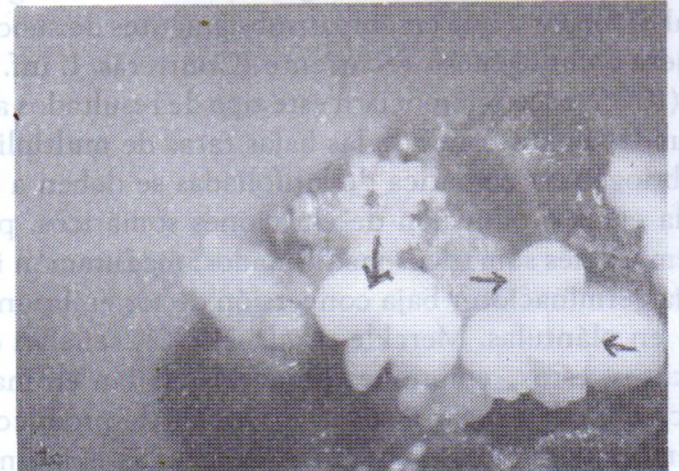


Figura 1. Diferentes etapas en la embriogénesis somática de C. ***odorata***.: **1a.** Protuberancias refringentes globulares blanquecinas; **1b.** Estructuras globulares y acorazonadas; **1c.** Embriones somáticos relativamente maduros. También puede observarse embriones globulares alrededor de los maduros.

Conclusiones

A partir de tejidos proembrionarios de árboles maduros, como los de embriones cigóticos inmaduros de ***Cedrela odorata*** L. se pudo generar **in vitro** embriones somáticos por vía directa o por embriogénesis recurrente. Este resultado abre la posibilidad a la regeneración masiva de árboles élite de esta especie.

Sin añadir otro complemento al medio de cultivo inicial, se pudo generar posteriormente, embriogénesis recurrente.

A pesar de que se logró inducir la formación de embriones somáticos por vía directa, no fue posible la germinación de éstos usando esta metodología.

Se hace necesario, ensayar, otros medios nutritivos y otros complementos orgánicos, para lograr la germinación de los embriones.

Bibliografía

Angarita de Torres, N. 1995. Ensayos de micropropagación**in vitro** de ***Cedrela odorata*** L, Tesis Magister Scientiae Centro de Estudios Forestales de Postgrado. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 59 p.

Contreras, I. y L., Valera (a). 1988. Micropropagación de***Eucalyptus globulus*** a través de cultivos **in vitro**. IX Congreso Venezolano de Botánica, Jardín Botánico de Caracas, Venezuela. p 101.

_____. (b). 1988. Micropropagación de***Pinus caribaea*** var. *hondurensis* y ***P. oocarpa*** **in vitro**. IX Congreso Venezolano de Botánica, Resúmenes. Jardìn Botánico de Caracas, Venezuela. p 102.

Gamborg LO., R A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrients requirements for suspension culture of soybean root cells. Exp. Cell. Resp. 50 :151-158.

Kurten, U., AM Nuutila, V., Kauppinen y M. Rousi. 1990. Somatic embryogenesis in cell cultures of birch (*Betula pendula*. Plant Cell Tiss. Org, Cult. 23:101-105.

Lahera, W., A. Alvarez y S. Gámez. 1995. Estado del programa de mejoramiento genético de ***Cedrela odorata*** L. desarrollado en Cuba. Recursos Genéticos Forestales. FAO, Roma, 22:27-28.

Merkle, SA., WA. Parrot y EG. Williams. 1990. Applications of somatic embryogenesis cloning En: SS. Bhojwani (Ed Plant Tissue and Cultures Applications and Limitations. Elsevier, Amsterdam. 219 p.

Merkle, SA. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in harwood trees. Plant, Tiss. & Biotech. 3:112-121.

Murashige, T., y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant. Physiol. 15 :437-497.

Vieitez, AM y J. Barciela. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21: 267-274.